

厚生科学研究費補助金
研究報告書
(総括研究報告書・分担研究報告書)
(新興・再興感染症研究事業)

**結核症及び非結核性抗酸菌症における生体防御機構
の解明とその予防・診断・治療への応用**
(H10-新興-3)

主任研究者
国立感染症研究所
山本 三郎

総括研究報告書

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

総括研究報告書

結核症及び非結核性抗酸菌症における生体防御機構の解明と
その予防・診断・治療への応用

主任研究者 山本 三郎 （国立感染症研究所）

研究要旨 結核症あるいは非結核性抗酸菌症においては、細胞性免疫反応が生体防御に大きな役割を演じている。本研究では、結核の発症制御機構の解明を目指し、予防・診断・治療について基礎的研究をおこなった。ワクチンの開発及びその評価系の確立に関する研究： α 抗原特に α -K抗原をモルモットに投与すると細胞性免疫及び液性免疫が著名に誘導されることを明らかにした。 α 抗原をBCGにトランスフェクションすると α -K遺伝子を使うことが最も有効に発現されることが判った。新しいタイプの抗結核候補ワクチンとして α 抗原蛋白、rBCG α 、pcDNA- α 、リコンビナントワクシニア α を作成した。Glas-Col社のエアロゾル噴霧感染装置を検討した結果、安全性に問題の無いことがわかった。またMadison社の装置では、ヒトの自然感染に近い条件の低用量結核菌噴霧感染が、短時間に、多数のモルモットに対して、繰り返し実施できることが確認された。なお、当該研究課題に関し、リサーチレジデント1名が「免疫増強性オリゴDNAのアジュバント活性の抗結核ワクチン開発への応用に関する研究」に従事し、免疫増強性オリゴDNAを組み込んだプラスミドの精製及びオリゴDNAの構造と機能について検討を行った。また研究者1名が「結核菌噴霧感染によるモルモット肺結核モデル系に関する研究」をおこなうため、米国Texas A&M大学に派遣され、BCG・抗結核タンパク質ワクチン候補及び抗結核プラスミドワクチン候補の評価をMadison社製装置によりおこなっている。

ヒト型結核菌とウシ型結核菌の鑑別診断に関する研究：結核菌群に特異的遺伝子の検索、プライマーの設計、遺伝子増幅、増幅産物の証明、プライマーの特異性について検討し、*M. tuberculosis*と*M. bovis*の鑑別診断する方法を確立した。これはこれまで不可能であった結核菌とBCGの鑑別診断を行う基礎検討である。

鑑別診断を結核と非結核性抗酸菌症の生体防御機構に関する研究：結核菌と同様の細胞内寄生性を示すリステリア菌の病原因子であるLL0について、その生物活性と宿主免疫応答の賦活への応用につき研究し、毒性（膜傷害活性）と宿主サイトカイン誘導活性は分離することがわかった。また、宿主感染防御機構におけるサイトカインの役割を中心に解析し、細胞性免疫の起動性サイトカイン、IL-12が抗酸菌感染防御に貢献していることが判明し

た。しかし、IL-12は肉芽腫炎症病変も増強した。すなわち、感染防御と病変形成が表裏一体であることが判明した。一方、ブタは*M. avium*感染症好発動物として知られることから、ブタの肺胞マクロファージを用いて豚のもつ*NRAMP1*遺伝子と*M. avium*感受性との関係について調べた。健康ブタ肺胞マクロファージにヒトを含む動物から分離された*M. avium*を感染させ、10日目までの菌数を個体間で比較した。また、RT-PCRにより*NRAMP1*mRNAの肺胞マクロファージにおける発現量を健康ブタと感染ブタを比較した。マクロファージ内における*M. avium*の増殖パターンは、株により著しく異なり、ブタ由来株は良く増殖し、ウシ由来株はほぼ横ばい、エイズ患者由来株は減少した。*NRAMP1*mRNAの発現量を健康ブタと感染ブタで有意差はみられなかった。さらに、*M. avium*がヒト単球に感染すると、GM-CSFによるマクロファージへの分化は抑制され、細胞死が誘導されたが、M-CSFによるマクロファージへの分化は抑制されないことが明らかとなった。2種類のCSFによる単球のマクロファージへの分化にたいする*M. avium*感染の異なる影響はIL-10の産生を一部介することが示唆された。また、ヒト末梢血単球由来マクロファージ(GM-マクロファージ、M-マクロファージ)のツベルクリン蛋白(PPD)応答Tリンパ球機能抑制活性を検討した。GM-マクロファージはinterleukin-10(IL-10)産生能を欠きTリンパ球の増殖を抑制するもののinterferon- γ (IFN- γ)産生は抑制しなかった。一方、M-マクロファージはIL-10産生能を有し、Tリンパ球のいずれの機能も抑制した。IFN- γ 産生がIL-10により抑制されることを、recombinant IL-10と中和抗体を用いた実験により示した。Tリンパ球の増殖とIFN- γ 産生がマクロファージの異なる機序で制御される可能性が示唆された。さらに、結核菌分泌タンパク質PPDおよびMPB64抗原の遅延型皮膚反応惹起能がモルモットとマウスで異なることを明らかにした。

分担研究者氏名・所属施設 における職名	後藤義孝	宮崎大学 助教授
	芳賀伸治	国立感染症研究所 主任研究官
小林和夫	国立感染症研究所 部長	山崎利雄
光山正雄	京都大学 教授	持田恵子
本多三男	国立感染症研究所 グループ長	国立感染症研究所 主任研究官
赤川清子	国立感染症研究所 室長	

A. 研究目的

1) 結核による新規感染は平成9年度の統計では43,000人に達し、死亡者数は約3,000人と報告されている。これらの結果から、新しいタイプの抗結核ワクチンの開発が緊急の課題の一つになっている。我々のグループでは、これまで抗酸菌の分泌する生理活性を持った蛋白を分子生物学的に明らかにしてきた。これらの成果をもとにして、以下の点について検討をする。①現在用いられているBCGワクチンを遺伝子学的に補強し、新しいタイプのリコンビナントBCG結核ワクチンを作成する。②BCGが分泌する分泌型蛋白を抗原に用い、コンポーネント結核ワクチンあるいはDNAワクチンとして使用し、抗結核効果を解析する。③抗結核効果を最大限に得るために①、②のコンビネーションの可能性と投与ルートの解析を行う。

2) 肺結核の動物実験モデルを構築する。モルモットはこれまで用いられてきたマウスよりも肺感染モデルとして優れていることから、モルモットを用いたモデル系の確立をすすめている。また、実験動物としてのサルが人の結核症のモデルとなりうるかの検討も進めている。ここで確立された動物モデルを持ちいて、肺結核に対して効果のある新ワクチンの評価をすすめる。

3) 現行法では、結核菌群(*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*)の菌種を同定することは難しく、結核菌群よりBCGを明確に鑑別同定する方法は無い。そのため、分子遺伝学的手法を用いて正確で、迅速な*M. bovis* BCGの鑑別同定法を確

立する。

4) 結核の原因となる結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)は、感染宿主のマクロファージに貪食されてもその細胞内殺菌をエスケープして生存増殖し、慢性肉芽腫性の病変を形成する。エスケープのメカニズムとしては、貪食されたマクロファージ内での食胞とリソソーム顆粒との融合を阻害することが第一義的と考えられるが、その関与する遺伝子や分子については全く解明されていない。一方、細胞内寄生菌による感染では、宿主に強い免疫応答が誘導され、細胞内寄生菌が宿主免疫応答を強く刺激することも事実である。そこで細胞内寄生性細菌の病原性およびエスケープ機構を分子生物学的に明らかにし、これらに対する感染宿主の免疫応答と両者の相互関係を解析することにより、宿主免疫賦活による感染症への新たなアプローチを確立することを目的とした。

5) 抗酸菌感染における宿主防御や肉芽腫炎症は、菌および宿主側両因子が関与する宿主-寄生体関係を介して成立し、抗酸菌と宿主の壮絶な生存戦争を反映している。幸運なことに宿主-抗酸菌寄生体関係において発病は10%以下であり、すなわち、宿主に抗酸菌感染防御機構が存在しているが、詳細は不明である。この機構の解明は抗酸菌感染症の予防・治療に貢献することが期待される。

6) マウスを用いた結核菌ならびに非結核性抗酸菌感染症モデルは、同感染症に対する免疫研究や感染防御実験などに利用され、

これまでに数多くの知見が得られてきた。ヒトを含め哺乳動物における抗酸菌感染に対する宿主抵抗性は、マクロファージなどの貪食細胞が関わる自然抵抗性とT細胞が関わる獲得抵抗性とに大別される。そのうち前者はマウスにおいては第一染色体上にある *NRAMP1* (Natural resistance associated macrophage protein) 遺伝子によってコントロールされていることが分かっている。同遺伝子産物はマクロファージ上に発現していると考えられているが、どのような機序で抵抗性発現に関わっているのかは全く分かっていない。同遺伝子は最初、弱毒の *M. bovis* BCG Montreal 株に抵抗する遺伝子として発見され、その後、トリ型結核菌をはじめとする非結核性抗酸菌に対する抵抗性に関与することが証明されたものの、病原性の強いヒト型ならびにウシ型結核菌に対するマウスの抵抗性がさほど強くないことから、結核菌感染に対する同遺伝子の関与は疑問視されてきた。しかしヒトをはじめマウス以外の動物においても *NRAMP1* 遺伝子のホモログが相次いで発見され、ヒトの結核をはじめとする感染症やある種の疾患と同遺伝子との関連性について興味を持たれるようになった。われわれはマウスの抗酸菌感染症モデルを用いて *NRAMP1* 遺伝子の役割についてこれまで研究を続けてきた。その結果、同遺伝子は感染初期のみならず、感染後期の感受性/抵抗性にも関与していること、感染刺激を受けたマクロファージから産生されるサイトカインプロファイルや同細胞のもつ抗原提示能力にも影響を及ぼすことをあきらかにした。結核ならびに非結核性抗酸菌症が慢性の感染症であることを考えると *NRAMP1* 遺伝子

はヒトや家畜においても感染の予後を左右する極めて重要な働きをしているように思われる。ただマウスは遺伝的特性はじめ生理学的特性や病理組織形態などがヒトとかなり異なっているため、同遺伝子の感染症における役割をより一層明確なものにするためには、マウス以外の動物を用いた感染モデルが必要ではないかと思われる。そこで今回はブタを用いた抗酸菌症モデルの作出を試みた。対象動物にブタを選んだ理由は、材料の入手が容易であることに加え、自然界において抗酸菌感染症が数多くみられること、その病理組織像がマウスのそれに比べてヒトのそれに近いこと、最近種々の細胞表面マーカーやサイトカインの研究が進み、免疫学的な研究も可能になってきたからである。また最近ブタの *NRAMP1* 遺伝子がクローニングされ、マウスやヒトの遺伝子との比較研究が可能になったことも理由のひとつとしてあげられる。豚の *NRAMP1* 遺伝子は第 15 染色体上に位置し、cDNA の全長は 1995bp で、人、牛、マウスの *NRAMP1* 遺伝子とそれぞれ 87%、88%、85% のホモロジーを有する。今年度はまずブタのマクロファージを用いた *in vitro* 感染モデルを作出したうえで、同細胞が発現しているであろう *NRAMP1* 遺伝子と感染抵抗性との関連を解析しようと試みた。

7) ヒト単球、マクロファージにおける結核菌や非定型抗酸菌の増殖と殺菌を制御する機構及び菌の感染が単球やマクロファージの分化や機能に与える影響を解明し、殺菌作用増強をもたらす方法を見出す。ヒト単球、マクロファージにおける結核菌や非定型抗酸菌の増殖と殺菌を制御する機構及

び菌の感染が単球やマクロファージの分化や機能に与える影響を解明し、殺菌作用を増強する方法を見つける。

8) 結核発症の主たる臓器である肺においては T リンパ球に対するマクロファージの比率が他の臓器に比べ高く、このような環境下ではリンパ球の機能は抑制されることが知られている。しかしながら、抑制活性を示すマクロファージの性状および機序は不明である。末梢血単球より二つの異なるコロニー刺激因子で分化誘導したマクロファージを肺胞マクロファージおよび腹腔マクロファージをモデルとして T リンパ球の機能抑制機序を解明する。

9) MPB64 (MPT64) はヒト型結核菌や *Mycobacterium bovis* BCG の一部 (日本株、ロシア株、モロー株など) の菌種が分泌する分子量 26Kda のタンパク質である。このタンパク質による遅延型皮膚反応は、BCG 生菌免疫モルモットでは陽性、死菌免疫モルモットでは陰性である。しかし生菌免疫モルモットであっても、体内の菌が排除され、少なくなるにつれ、皮膚反応は急速に減弱することが知られている。一方、ヒト型結核菌生菌をモルモットに注射した場合、生体内での菌の増殖がそれほど大きくない時期においても、皮膚反応は陽性を呈することから、ヒトの活動性結核を早期に診断する方法として期待されてきた。しかし、MPB64 抗原に対する生菌免疫モルモットに比べ、結核患者の遅延型皮内反応は、活動性結核患者においてさえ、著しく弱い。そこで、この原因を探るため、BCG 生菌免疫マウスにおける MPB64 抗原の細胞性免疫応

答能を、遅延型皮膚反応、*in vitro* のリンパ球増殖反応及びインターフェロン γ 産生能で検討した。

B. 研究方法

1) リコンビナント BCG 結核ワクチンの作成
標的遺伝子として結核菌の有する分泌型の α 抗原蛋白及び類似の蛋白に着目し、その遺伝子を BCG 東京株に発現させる。さらに培養液中に遊離する蛋白を Western Blot 法で確認し、リコンビナント BCG を作成した。

DNA- α 抗原ワクチンの作成

α 抗原をベクター (pcDNA3) のサイトメガロウイルス・プロモーター直下に組み込んで作製した。さらにその発現は M 細胞にベクターをトランスフェクトし、抗原の発現をフローサイトメーターで確認した。

α 抗原をモルモットに投与し、免疫誘導能を解析した。

2) 米国 Glas-Col 社のエアロゾル噴霧感染装置を導入し、実験の安全性 (実験従事者への感染の可能性及び環境への暴露) のテストを繰り返している。モルモットへ *M. smegmatis* F21 株を感染後、毛の部分を持って小川培地に塗布した。噴霧菌量は F21 株を 0.05% Tween80 水中に 6000 万 CFU/ml が含まれる菌液 2ml 全部を 30 分間かけてエアロゾル化し噴霧した。装置内別々の部分 10 数カ所についても菌の残存を同様に検討した。

モルモットに結核菌 H37Rv を 5500CFU 静注感染、又は 18 万 CFU を皮下感染し経時的に結核菌分泌蛋白 MPT64 による皮膚

DTH 反応やこの蛋白に対する血中抗体価と脾臓内の結核菌還元培養の成績とを比較した。

モルモットに BCG 0.5mg を皮下免疫し経時的に BCG 分泌蛋白 MPB64 による皮膚 DTH 反応やこの蛋白に対する血中抗体価と脾臓内の BCG 還元培養の成績とを比較した。

カニクイザルに BCG 0.05mg (人への接種と同じ量)を免疫し PPD による皮膚反応を経時的に観察後、反応局所を一部摘出し病理学的観察をおこなった。なお実験群は現在 BCG 接種後 2 年目を経過している。

3) 結核菌群に特異的遺伝子の検索を行い、*pab*、*mtp40*、*MPB64*、*pncA* といった遺伝子を選択した。著者報告プライマーを合成し、結核菌群の各参照株 DNA を用いて PCR を行い追試をした。ダイレクトシーケンス法により PCR 増幅 DNA の塩基配列を調べ、より適切なプライマーを設計し合成した。これらのプライマーを用いて、結核菌群の臨床分離株について鑑別同定可能かを調べた。

4) リステリアのエスケープ因子であり同時に主要病原因子でもあるリステリオリン O(LLO)の各種リコンビナント標品を作成した。LLO をコードする遺伝子 *hly* のリーダーシーケンスを外した遺伝子、さらに C 末端側のペプチドをコードする遺伝子を順次欠失させた遺伝子を PCR 法にて作成し、その際に N 末端側に 6 x His の tag を標識した。作成したフルサイズおよび欠失変異遺伝子を大腸菌に電気穿孔法で導入し、遺伝子発現により産生される LLO 蛋白を、

His-tag を利用してニッケルカラムで精製した。

精製した各種リコンビナント標品の毒素活性(膜傷害活性)とマウス脾細胞に対するサイトカイン誘導活性をしらべ、それぞれの責任部位の特定を試みた。また両活性のコレステロール処理に対する感受性を比較した。サイトカイン誘導活性については、誘導されるサイトカインを RT-PCR 法や ELISA による定量法によりしらべ、特に重要な IFN- γ の誘導過程を解析した。また、フルサイズの LLO をリボソームに封入してマウスに投与し、単独では感染防御免疫誘導能を示さない死菌や LLO(-)菌株、BCG 死菌との併用による感染防御免疫誘導への応用を試みた。

5) 純系マウスに抗酸菌(非結核性抗酸菌やらい菌)を接種し、病変局所における宿主免疫応答を解析した。また、得られた成績を基に、免疫強化療法の可能性について探索した。

6) *M. avium* は東京大学医科学研究所の中田光博士より分与されたエイズ患者由来株 2 株 (No.10 と No.48-3)、牛の全身性抗酸菌症から分離した 1 株 (cattle)、豚の全身性抗酸菌症と限局性抗酸菌症から分離されたもの各 1 株 (Mj21 と Mj6-2) の計 5 株を感染実験に供した。1%小川培地(日水製薬、東京)で培養されたこれらの株を 10%OADC enrichment を添加した Middle brook 7H9 Broth(Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA) 培地に移し、37°C で 7 日間培養した。菌液は-80°C に保存した。

7) ヒト末梢血よりリンホブレップにて分離した単核球より、MACSによりCD14陽性の細胞を回収し、その後プレートにて附着させ純度の高い (>96%) CD14陽性単核球画分を得た。これら単核球をGM-CSF (500 U/ml) または M-CSF (104 U/ml) 存在下に7日間培養することによりマクロファージへの分化を誘導した。形成されたマクロファージの数は、セタブロン法により測定した。非定型抗酸菌としては、*M. avium* に NIHJ-1605 株を用い、moi 5-10 で培養開始時に感染させた。

8) ツベルクリン (PPD) 皮膚反応陽性者の末梢血単核球 (PBMC) より分離した単核球を、GM-CSF あるいは M-CSF 存在下に1週間培養し、GM-マクロファージおよびM-マクロファージを誘導した。これを同じドナー由来PBMCに加え、PPD刺激によるDNA合成とIFN- γ 産生を測定した。

9) MPB64 は、松尾・田坂らによって開発されたリコンビナントMPB64 (rMPB64) を用いた。このタンパクはMPB64遺伝子を迅速発育抗酸菌である *Mycobacterium smegmatis* で発現させたもので、大腸菌に発現させたものと異なり、分泌型であり、したがって、大腸菌 rMPB64 のように、菌を破碎して菌体内部からこのタンパクを取り出す操作は不用である。動物は、8-12週令の雌 BALB/c および C57BL/6 マウス (SPF) を日本クレアから、体重 300-350g の雌ハートレーモルモット (クリーン) を SLC から購入して用いた。BCG は日本株を用いた。BCG の生菌免疫は、 7.2×10^7 CFU (1mg) をモルモットまたはマ

ウスの皮下に注射しておこなった。モルモットの遅延型皮膚反応は、抗原 0.5—2 μ g/0.1ml を皮内接種し、24時間後の硬結と発赤を測定した。マウスは、左後脚足蹠 (フットパッド) に抗原 2 μ g/0.05ml を、右後脚足蹠に生理的食塩水を注射し、24時間後に両足蹠の腫脹差を測定し遅延型アレルギーの指標とした。細胞増殖反応は、免疫したモルモットまたはマウス脾細胞 2×10^6 cells/ml と抗原 (PPD または MPB64) を混合培養し、 3 Hチミジンの取り込みを測定した。脾細胞 1×10^7 /ml と抗原を24時間培養した上清中のIFN- γ はELISAによって測定した。

C. 研究結果

1) モルモットにおけるリンパ球増殖法の開発

モルモットの全血を使ってPHA及びConAで刺激すると 1.4×10^5 細胞あるいは全血15mlを使った時ステミレーションインデックス (SI) が20~60得られることがわかった。さらにモルモットの脾臓細胞をPHA及びConAで刺激すると 1×10^5 の細胞濃度の時にSIが100前後上昇することが明らかになった。これらの条件を用いて α 抗原を特異抗原としてモルモットにコンプリートアジュバンドと免疫すると、免疫1週間目で有意に増殖反応が認められ、約1カ月後ピークに達する。約40日後、インコンプリートアジュバンドでブースターをかけるとSIは10倍前後から50~100倍に上昇する。

α 抗原に対する抗体産生能を解析すると抗原刺激後1週間で抗体価の上昇が認められ、3週間でピークに達する。40日目にコンプ

リートアジュバンドでブースターをかける
と抗体価は著名に上昇し、1:250万に達す
る。実験に用いて70日前後でも1:150万
の高い抗体価を持続していた。

α -K 抗原遺伝子を DNA ワクチン作成用ベ
クターである pcDNA3.1 に挿入し、pcDNA
 α -K DNA ワクチンを作成した。その発現
を確認するために M3.5.1 細胞にトランス
フェクションし、細胞を薬剤耐性下で培養
し、さらに細胞をクローニングした。 α 抗
原の発現をフローサイトメーターで確認す
ると No.1, No.2 のいずれのクローンも細胞
表面に α 抗原を著名に発現していることが
確認された。

α 抗原遺伝子とシャトルベクター pSO 及び
pIS の 2 種類のベクターに挿入し、BCG 東
京株にトランスフェクションし、培養液中
の遊離される α -K 蛋白を Western Blot 法
で確認した。この発現は rBCG をモルモッ
トに投与し α -K 蛋白で DTH を誘導するこ
とにより確認した。さらに α -K 特異的抗体
の産生能でも確認することができた。

2) エアロゾール感染の安全性を検討した
結果、毛の部分についてはいずれも菌の検
出は認められなかった。特にモルモットの
腹部は紫外線(噴霧感染後に動物と共に装
置内が照射される)が直接照射されないに
もかかわらず菌の検出はできなかった。同
様に、エアロゾールが直接あたり紫外線照
射のない底部の板の裏側からも菌が検出
出来なかった。チャンバー内の他の部分か
らも菌の検出が認められなかったが、一カ所
ガラスネブライザーとチャンバーへつなが
るパイプの繋ぎの部分に大量の菌が検出さ
れた。これは噴霧終了後滅菌の為にネブラ

イザーを取り去ると同時に別の空のネブ
ライザーを装着し空運転することで対処し
た。なお、この時モルモットの肺内の F21
株の還元培養では肺あたり 3000CFU が分
離された。エアロゾールはいわゆる加湿器
で細かい水滴を発生させるものと異なりガ
ス状の気体のようなもので、噴霧中でもチ
ャンバー内はほとんど曇らない。このよう
なエアロゾールの性質から動物の毛やチ
ャンバー内に多量の菌が残らず肺内に吸い込
まれた以外の菌はすべて装置内のヘパフィ
ルターに補足されてしまうか、UV 照射で
生成するオゾンで殺菌されてしまうのであ
ろう。

MPT64 や MPB64 抗原の皮膚 DTH 反応や
抗体価測定の値と菌の分離培養の成績がよ
く平行した。

カニクイザルのツベルクリン反応は通常は
上眼瞼で行うが、モルモットと同様に横腹
の部分でも可能であった。この方法により
部位を変えての皮膚反応の観察が可能とな
り、又反応部位局所の摘出による病理学的
観察が可能となった。BCG 接種 2 年後でも
ツベルクリン反応が観察され、その局所の
免疫組織検査では、マクロファージの高度
の集積及び T 細胞、CD8 陽性細胞の集積が
観察された。CD4 陽性細胞は少数が観察され
た。この他に NK 細胞やケモカインレセプ
ター (CCR-2, CCR-5, CXCR4) の発現した
細胞も多く集積していた。なお単クローン
抗体は T 細胞に対するものを除き人と猿と
交差するものを FACS にて検索し用いた。

3) 結核菌の pab 遺伝子をコードするプラ
イマー MT-1, MT-2 を用いた PCR では、*M.*
tuberculosis, *M. africanum*, *M. bovis*, *M.*

microti の 4 菌種全て 419bp の DNA が増幅された。mtp 40 遺伝子をコードするプライマー PT-1, PT-2 を用いた PCR では、*M. tuberculosis* は、319bp の DNA が増幅される。しかし、*M. tuberculosis* 46 株中 37 株は増幅されたが、9 株は増幅されなかった。*M. africanum* 5 株は、全て増幅され 396bp のバンドが確認された。また、*M. bovis* 14 株と *M. microti* 1 株は、全て増幅されなかった。MPB64 遺伝子をコードするプライマー T-2, T-6 を用いた PCR では、*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti* の 4 菌種全て 241bp の DNA が増幅された。しかし、BCG の 4 株 (Copenhagen, Glaxo, Pasteur, Tice) の DNA は増幅されなかった。これらの 4 株は、サザンブロット法により MPB64 遺伝子が欠損していることがわかった。

pncA 遺伝子をコードするプライマー pncA-7, pncA-8 を用いた PCR では、結核菌群の 4 菌種全て 561bp の DNA が増幅された。しかし、ダイレクトシーケンス法により pncA 遺伝子内の 169 番目が、*M. tuberculosis* は Cytosine、*M. bovis* は Guanine になっていることを確認し、この違いを利用し、プライマー pncA-10 と pncA-11 を設計した。pncA-7, pncA-10 は、*M. tuberculosis* 検出用に、pncA-7, pncA-11 は、*M. bovis* 検出用に用いることが可能であることを確認した。

4) 各種のリコンビナント LLO 標品を合成することが可能となった。フルサイズのリコンビナント LLO には、赤血球溶解 (溶血) 活性で検出可能な細胞膜傷害活性と、マウス脾細胞に対する強いサイト

カイン誘導活性がみられた。前者はコレステロールによる前処理で完全に阻害されたが、サイトカイン誘導活性はコレステロール処理でも阻害されなかった。

C 末端から順次一定サイズのペプチドを欠失させた変異 LLO では、C 末端約 40 アミノ酸の欠失で細胞膜傷害活性がみられなくなり、とくに ECTGLAWEWWR のウンデカペプチドの存在が必須と考えられた。一方サイトカイン誘導能はこれを欠失させても消失しなかった。さらに N 末端よりのアミノ酸を約 150 欠損させると、サイトカイン誘導能も消失した。サイトカイン誘導能は変異 LLO においてもコレステロール処理に抵抗性であった。

LLO により各種の炎症性サイトカイン産生が誘導されるが、まずマクロファージを刺激して proinflammatory cytokine を産生させ、さらにこれらの作用により NK 細胞が活性化されて IFN- γ 産生が誘導されることが、in vitro での脾細胞刺激実験で示された。マクロファージ由来のサイトカインのうち、とくに IL-12 と IL-18 が NK 細胞刺激に主要な作用をしていることが、抗サイトカイン抗体による中和実験で明らかとなった。

リコンビナント LLO は単独では毒性を発揮するため、リポソームに封入してマウスへの投与が可能であった。単独では感染防御免疫の誘導 (TH1) がみられない、リステリアの死菌、LLO(-) 株および *M. bovis* BCG の死菌による免疫と併用することにより、それぞれ抗原特異的な TH1 細胞の分化誘導がおり、攻撃感染に対する防御免疫を成立させることができた。

5) *In vivo* *Mycobacterium avium* や *M. leprae* 感染により、抵抗性および感受性純系マウスでは IL-4 発現 (遺伝子および蛋白) を除いて明瞭な差異が認められた。すなわち、感受性マウスは IFN-g に代表される 1 型ヘルパー-T (Th1) 細胞反応不全を呈しており、この不全は Th2 反応 (IL-4) に非依存性であり、IL-12 や IFN-g-inducing factor (IGIF/IL-18) などの IFN-g/Th1 誘導性サイトカイン発現不全に起因していた。IL-12 や IGIF/IL-18 の主要な産生細胞がマクロファージであることを考え併せると、感受性マウス由来マクロファージに内因性欠陥が示唆される。Th2 非依存性 IFN-g/Th1 誘導性サイトカイン発現不全は IL-12 投与 (Genetics Inst., Cambridge, MA) により是正され、*in vivo* 感染菌数を用量依存的に減少させた。IL-12 投与は感染成立後も有効であり、この効果は投与終了後も継続したことから、おそらく、IL-12 が感染宿主内で殺菌作用を発揮したと考えられる。サイトカイン療法における負の側面として、宿主における局所的 (病変部) および全身的 (臓器障害) 副反応を検索した。IL-12 投与により、局所反応として、肉芽腫炎症は増強し、また、全身性反応として、血液 (汎血球減少症)、肝や筋毒性を認めた。IL-12 療法は確かに感染防御 (正の側面) に貢献したが、毒性 (負の側面) も惹起した。

6) ブタ肺胞マクロファージによる菌の貪食 マクロファージによる菌の取り込み能力を菌株ごとに比較した。この実験には 3 頭のブタを用い、感染後 1 時間目の細胞内生菌数を貪食された菌数とみなした。エイ

ズ患者由来株 No. 48-3 は他の 4 株に比べて取り込まれた菌数が多く、次いで Mj 21、ウシ由来株、Mj 6-2 の順となった。しかし、いずれのマクロファージも各株の貪食率に有意差は認めなかった。

肺胞マクロファージ内における *M. avium* の推移 個々のブタ肺胞マクロファージに由来の異なる株を感染させ、経日的に細胞内の生菌数を調べた。結果を Fig. 1 に示す。いずれの個体のマクロファージも、感染 1 日目に最も多くの生菌が回収されたのは Mj 21 (ブタ由来株) で、ウシ由来株、エイズ患者由来 2 株の順に多かった。Mj 21 はただ一例を除き最初減少傾向を、5 日目以降からは増加傾向を示した。ウシ由来株は感染期間を通じてほぼ横ばいを示し、エイズ患者由来 2 株はいずれの豚由来マクロファージにおいても増殖は認められなかった。Mj 6-2 株はブタの全身性抗酸菌症から分離した株であるが、局所性リンパ節炎から分離した Mj 21 株と同様のパターンを示した。健康ブタ 5 検体の *NRAMP1* 遺伝子発現量の比較 全検体において、*NRAMP1*、*GAPDH* 発現が確認され、その発現量は肉眼的には差は認められなかった。画像処理をした、*GAPDH* 発現量に対する *NRAMP1* 発現量の割合はいずれの個体もほぼ同じであった。

局所または全身感染例における *NRAMP1* 遺伝子の発現

健康ブタと感染例において *NRAMP1* 発現量の *GAPDH* 発現量に対する割合をそれぞれ算定し、個体ごとに比較をしたところ、局所性の病変をもつほとんどの個体は健康な個体とほぼ同レベルの発現を示し、*NRAMP1* と *GAPDH* の比率もほぼ同じであった。しかし、全身例と局所例のうちの 1 例は有意に高い

値を示した。

ブタ *NRAMP1* 遺伝子の DNA 解析 Tuggle らの報告したブタ *NRAMP1* 遺伝子塩基配列 (Tuggle ら *J. Anim. sci.* 75:227,1997) と、今回得られた抗酸菌感染症例を含む計 9 検体の *NRAMP1* 遺伝子のシーケンスの比較を行った。554 番目と 617 番目の塩基が既報ではアデニンであるのに対し、今回は全例グアニンで、アミノ酸レベルでは前者がアルギニンからグリシンに、後者ではアスパラギンからアスパラギン酸へと変化していると推定された。また、691 番目はシトシンでこれも Tuggle らの報告にあるチミンとは異なっていたが、アミノ酸レベルでは同じであった。さらに、検体 No. 3 だけが 587 番目のグアニンがアデニンとなり、アミノ酸レベルではバリンからイソロイシンへの変異が推定された。なおシーケンス解析は複数回行い同じ結果が得られることを確認している。マウスにおける変異部分、すなわち *Bcg*^s マウスにおける 506 番目の塩基置換 (G→A; アミノ酸レベルではグリシン→アスパラギン酸) は、ブタでは同遺伝子の 5' 末端から数えて 570 番目のグアニンに相当し、*Bcg*^s マウスと同様、アミノ酸はグリシンでこちらはすべての検体で同じであった。

7) ヒト単球を GM-CSF 及び M-CSF 存在下に培養すると細胞死はおきず、それぞれの特徴を有するマクロファージへの分化が認められた。しかし培地のみで培養するとほとんどの細胞は死んでしまう。単球に *M. avium* を感染し、培地のみで培養すると、感染しなかった場合に比べ生存する単球の数が増加し、またマクロファージへの分化

が認められた。M-CSF による単球のマクロファージへの分化は、感染により著名な影響を与えられなかったが、GM-CSF 存在下に培養した群では、GM-CSF が存在するにも関わらず、単球の細胞死が誘導され、培地のみで感染させた場合と同様の数のマクロファージしか分化誘導されなかった。既に IL-10 が M-CSF による単球のマクロファージへの分化を増強することを報告したが、GM-CSF によるマクロファージへの分化にどのように影響するか単球を GM-CSF と IL-10 共存下に培養すると *M. avium* 感染の場合同様単球の細胞死及びマクロファージへの分化が抑制された。

8) GM-マクロファージと M-マクロファージは PBMC による DNA 合成を同程度に抑制したが、M-マクロファージのみが IFN- γ 産生を抑制した。M-マクロファージは分化誘導の過程で、また、誘導後に PPD 刺激で interleukin-10 (IL-10) を産生したが、GM-マクロファージは産生しなかった。M-マクロファージが産生するレベルの recombinant IL-10 は IFN- γ 産生を抑制したが、DNA 合成抑制にはより高濃度の IL-10 を要した。IL-10 に対する中和抗体は M-マクロファージによる IFN- γ 産生抑制を回復させたが、DNA 合成抑制は回復させなかった。

9) BCG 生菌により免疫したモルモットに、4 週後、PPD または MPB64 を皮内注射したところ、MPB64 の遅延型皮膚反応は PPD と同程度の陽性反応を示した。BCG 生菌免疫マウスでは、PPD に対する足蹠反応は BALB/c、C57BL/6 とともに強い遅延型ア

レルギー反応を呈したが、MPB64については、いずれの系統のマウスでも弱い反応であった。

BCG生菌免疫4週後のBALB/cマウス脾細胞を、各抗原と培養し、3-7日間培養し、培養終了16時間の³Hチミジンの取り込みをシンチレーションカウンターで測定したところ、PPD、MPB64とも5日間培養がもっとも高い放射能取り込みを示すことがわかった。次に、BALB/cマウス脾細胞とC57BL/6マウス脾細胞をそれぞれの抗原と培養したところ、BALB/cがC57BL/6より高い取り込みを示した。

BCG生菌免疫4週後のBALB/cマウス脾細胞と各抗原を培養し、24時間後の培養上清中のIFN- γ 量をELISA法で測定したところ、脾細胞をPPDと培養した場合に比べ、MPB64との培養では、IFN- γ 産生は非常に少ないことがわかった。一方、脾細胞からmRNAを抽出し、RT-PCR法で調べたIFN- γ mRNA量は、PPD刺激とMPB64刺激との間に、大きな差異は認められなかった。

D. 考察

抗結核ワクチンの方向性として我々がクローニングした α 抗原及び α 抗原類似の遺伝子はその研究に用いられつつある。我々は約10年前から α 抗原のDTH誘導能及び結核菌からの多量分泌能に着目し、種々のリコンビナントBCGを作成してきた。今回10年度の研究ではまず、挿入した α 抗原の安定性を強化するために小型のシャトルベクターであるpSOタイプのベクターを用いrBCGを作成することができた。さらに抗結核能を増幅するためにいくつかの方向か

ら検討した。まず、 α 抗原がワクチン抗原として有用であるかどうかを精製した α -K抗原を用いて検討すると α 抗原特異的なリンパ球増殖能が著名に上昇することがわかった。さらに、 α 抗原特異的な液性免疫の上昇が認められる α 抗原がワクチン抗原として有用であることが明らかにされた。この蛋白抗原の免疫反応の増幅はBCG投与による免疫反応とは異なっており、ブースター効果が投与方法により極めて有効に長期間作用することが判った。

そこで、 α -K抗原を用いてDNAワクチンを作成した。この α 抗原を組み込んだDNAワクチンの発現を細胞にプラスミッドトランスフェクションして確認することができた。今後、このDNAワクチンをin vivo投与し、その発現を免疫誘導能について確認する予定である。さらに、細胞性免疫能、特に α 抗原特異的なCTLの誘導を確認するために α 抗原を用いたリコンビナントワクシニアを作成中である。このリコンビナントワクシニアは弱毒化されているのでワクチン抗原としても使用可能である。今後、これらの系をin vivoでその発現を確認した後、結核に対する防御免疫能の誘導とその増幅について検討する予定である。

モルモットを用いたエアロゾル噴霧感染及び肺からの菌の還元培養成績とMPB64やMPT64抗原による皮膚反応や抗体価測定とを組み合わせることにより肺結核に対するワクチン効果の有無を知ることが可能と考えられる。

mtp 40 遺伝子をコードするプライマーPT-1、PT-2を用いた場合、396bpのPCR増幅バンドが検出されると*M. tuberculosis*と言える。*M. africanum*はかつてアフリ

力の結核患者から分離された菌種で、生化学的方法では *M. tuberculosis* と *M. bovis* の中間であったために *M. africanum* という菌種名がつけられた。今回の検討では *M. africanum* 5 株は全て増幅されたことから、*M. africanum* は *M. tuberculosis* と同義語としても良いと考える。

抗酸菌より結核菌群を迅速に同定する方法は、既に臨床検査で用いられている。しかし、結核菌群より *M. bovis* を鑑別したという報告はあるが、BCG を明確に鑑別する方法は無い。そこで、BCG の鑑別同定を最終目標に研究を開始したが、今年度は、*M. tuberculosis* と *M. bovis* の鑑別までしかできなかった。わが国では、牛に接する機会が無い人から分離された抗酸菌が、*M. bovis* のパターンをとれば、BCG と断定して差し支えないと思われる。しかし、酪農家や、酪農国では BCG を明確に鑑別することが望まれている。最近、Cole らにより、結核菌 H37Rv 株の全塩基配列が報告されたので、文献的に報告されている遺伝子の再検討をおこない、*M. bovis* BCG 特異的な塩基配列を検索する必要がある。

今回の実験で、細胞内寄生菌のひとつリステリアのエスケープ因子である LLO には、毒素蛋白としての膜傷害活性と、宿主免疫応答の誘導つまり抗原特異的 TH1 細胞の分化誘導を促す IFN- γ の産生誘発活性の、2 つの活性があることが示された。さらに興味あることには、これらの活性は単一ポリペプチドに担われているにも関わらず、解離させることが可能であり、それぞれの責任部位が異なるらしいことが示された。マウスへの投与実験

によって、単独では防御免疫誘導活性のない死菌などでも強毒生菌と同等の防御免疫が誘導できる結果が得られた。従って、毒素活性を欠失させサイトカイン誘導活性を維持したリコンビナント標品によって、より安全に宿主免疫応答を賦活したり、精製抗原との併用による TH1 免疫の誘導が可能になると考えられた。

一方まだ成果には至っていないが、結核菌由来のいくつかの因子による宿主サイトカイン誘導活性の検索も開始しており、これとは別にマクロファージ内エスケープを可能にする結核菌のエスケープ因子を探索する実験系も確立しつつある。従って、リステリアの実験系の発展と同時に、結核菌に関する同様の研究も今後展開が期待される。

抗酸菌感染感受性マウスには内因性マクロファージ欠陥があり、そのため、感染防御性マクロファージ由来サイトカイン (IL-12 や IGIF/IL-18) 発現不全を招来し、防御不全を呈していることが判明した。この欠陥は IL-12 補充療法により是正され、感受性マウスにおける防御は増強した。補充療法は多剤耐性抗酸菌 (*M. avium*) 感染症にも有効であった。これらの成績から、サイトカイン補充療法の臨床応用を考慮した場合、1) 免疫不全宿主や 2) 薬剤耐性抗酸菌感染が適応となる可能性を示唆している。

IL-12 補充療法は感染防御 (正の側面) に貢献したのみならず、宿主における局所的 (肉芽腫炎症増強) および全身的 (臓器障害) 不利益な反応も惹起したことから、今後、サイトカイン補充療法において、投与方法 (間欠、持続、抗菌化学療法薬との

併用)、薬物分配系(局所集中、全身投与)、投与量、投与時期などを含め、宿主に不利な反応を少なくすることが課題である。この課題の解決は防御性サイトカイン(IL-12 など)発現を誘導する新規ワクチン開発にも必須である。

Th2 非依存性 Th1 反応不全は IL-12 などの IFN-g/Th1 誘導性サイトカイン補充投与より是正され、マウスの抗菌活性は増強した。免疫強化療法への戦略転換は抗酸菌のみならず、種々の微生物感染症にも貢献するであろうし、また、免疫強化療法と抗菌化学療法の併用療法も感染症制圧における新たな武器となるであろう。

感染直後(1時間後)と24時間後の細胞内生菌数を比較したところ、前者では菌株間で大きな違いがみられなかったが、後者では株間で有意の差が認められた。1時間目における菌貪食率に有意差がみられないことをあわせて考えるならば、株間に見られた差はマクロファージのもつ菌の処理能力の差というよりもむしろ菌側のマクロファージに対する抵抗力の差を反映しているものと思われる。菌のマクロファージへの侵入性や細胞内での増殖性を比較した研究では、細胞内で培養した株と、培養液のみで培養を続けた株では前者の方が後者よりも6倍から8倍も高い効率で侵入性を示し、その後の細胞内における増殖率も異なっていた。さらに両株に対する侵入に関わるマクロファージ側のレセプター(β 1インテグリンやトランスフェリンなど)が異なっており、細胞内への侵入経路が異なると病原性にも違いが生じると述べている。こうした一連の実験結果は、それぞれの株はその由来となった動物のマクロファージ内での

増殖を介して、異なる性状や病原性を獲得できる可能性を示唆している。このように *M. avium* 感染症における菌側の要因を全く無視することは出来ないが、やはり、抗酸菌症が発症するか否かは、宿主側の防御能に依存しているといえるだろう。

宿主感染防御機構において遺伝子、細胞や生理活性物質(サイトカインなど)が役割を演じているが、本分担研究ではサイトカインを中心に解析した。その結果、細胞性免疫の起動性サイトカイン、IL-12 が抗酸菌感染防御に貢献していることが判明した。しかし、IL-12 は肉芽腫炎症病変も増強した。すなわち、感染防御と病変形成が表裏一体であることが判明した。

豚の肺マクロファージにおける *NRAMP1* の発現量を比較した。RT-PCR 法ではその性質上、mRNA 発現量を正確に定量することは容易ではなく半定量的なものにならざるを得ない。RT-PCR ではバンドが検出されるので、おそらくは産生される mRNA の量的問題であろう。RT-PCR により増幅した健康豚と感染豚の *NRAMP1* 遺伝子の塩基配列を比較した結果、健康豚 1 検体を除いては塩基配列が全く同じだった。Sun らによる豚 *NRAMP1* に関する報告(Sun ら *Anim. Genet.* 29:138, 1998)によると、豚 *NRAMP1* にはバリエーションがあるらしく 11 系統の豚を含む集団から 3 つの対立遺伝子が見い出されたという。そのうち A 対立遺伝子は *dam*(white) 系統のみで、C 対立遺伝子は *sire*(colored) 系統のみで認められたという。今回用いた検体はいずれも white 間の交雑で、遺伝的に均一な集団ではないので、シーケンスをおこなう際に対立遺伝子についても十分考慮する必要がある。抗酸菌

症は white、colored いずれにも認められるが、両系の感染に対する感受性差などはほとんど調べられていない。今後、各系統の病豚と健常豚における *NRAMP1* 遺伝子の全塩基配列を分子遺伝学的に比較するとともに、同タンパクに対する抗体を作成し、免疫学的解析をおこなうことにより、豚 *NRAMP1* の抗酸菌感染症における役割を明らかにできるかもしれない。

ヒト 単球は、CSF 非存在化に培養した場合、アポトーシスを起こすことが知られているが、CSF 存在下では生存及びマクロファージへの分化が誘導される。今回、単球に *M. avium* を感染させると単球のアポトーシスが一部抑制され、単球の生存とマクロファージへの分化が誘導されることが知られた。このような感染により単球のアポトーシスの抑制が起きることは既に他の研究者によって *M. avium* だけでなく、結核菌などでも報告されているが、その機構の詳細に関しては不明な点が多く今後明らかにしていく必要がある。また、CSF を共存した場合、M-CSF によるマクロファージへの分化は *M. avium* 感染により著明な影響を受けなかったが、GM-CSF による

マクロファージへの分化は影響を受けることが知られた。この場合、回収されるマクロファージの数は、CSF 非存在下の場合と変わらないことより、GM-CSF の作用が全く

認められなくなることが明らかになった。先に、我々は、既に IL-10 がヒト単球の M-CSF による M ϕ への分化を増強することを報告したが、今回 IL-10 は、GM-CSF による分

化を抑制し、単球の細胞死を誘導することを認めた。*M. avium* はヒト単球からの IL-10 の産生を強く誘導することが知られていることより、M-CSF と GM-CSF による単球のマクロファージへの分化に対する *M. avium* 感染の異なる影響は、IL-10 の産生を介することが示唆された。現在、これらの系における IL-10 の関与について検討中である。今回の結果から、*M. avium* の感染は、抗原呈示機能の強い GM 型マクロファージの単球からの分化を積極的に抑制して結核の感染防御免疫応答を抑制すると考えられる。しかし、一方で、Fc レセプター依存性の貪食能や、殺菌に必要な活性酸素産生能、IL-10 産生能の強い M 型のマクロファージの分化を促すことにより、エフェクター機能を増強している可能性が示唆された。現在、これらの系における菌の増殖や殺菌がどのようになっているか検討を加えている。

健常者肺胞マクロファージの性状は GM-マクロファージにほぼ等しいことが表面マーカーや液性因子産生様式などから推測されている。一方、M-マクロファージの性状は腹腔常在マクロファージや慢性炎症反応後期に出現するマクロファージに近く、慢性喫煙者の肺胞マクロファージもこれに類することが報告されている。T リンパ球による IFN- γ 産生は結核免疫誘導に重要な Th1 タイプ応答の指標とされ、IFN- γ 産生の有無が免疫応答を決定するとも言える。

結核菌感染時に GM-マクロファージタイプのマクロファージが肺を占めることの利点は、T リンパ球の増殖は抑制してもマクロファージの抗菌活性を高める IFN- γ 産生は抑制しないことであり、自然抵抗性の一環

を担うものと考えられる。しかし、M-マクロファージが優勢となる環境下では、IFN- γ 産生の抑制から抗菌活性も低下し、宿主の感染抵抗性も低下すると予測される。肺胞マクロファージの形質変化が感染免疫の決定に重要ではないかと思われる。

MPB64 は結核菌とある種の BCG 亜株に存在するタンパク質であり、モルモットに対しては、強い皮膚反応惹起能を有することから、現行のツベルクリンにかわる結核の診断薬として注目されている。しかし、モルモットとマウスでは MPB64 に対する遅延型皮膚反応の発現が異なること、マウスでは、MPB64 による IFN- γ 産生誘導能が弱いことが示された。これは、菌が体内で活動中のヒト結核患者の MPB64 皮内反応がほとんど陰性である事実と良い一致を示すものである。

E. 結論

感染研のバイオハザード対策が施された P3 動物実験室で、決められた手順を遵守して実験する限りに於いては、エアロゾル噴霧感染の安全性には問題の無いことがはっきりした。感染研 P3 施設は「国立感染症研究所病原体等安全管理規程」にもとづき運営されており、事故時の対応マニュアル等細かく規定されている。動物実験を行う場合は合わせて「国立感染症研究所実験動物管理運営規程」に基づき実験を進めている。

モルモットを用いたエアロゾル噴霧感染は肺結核の研究やワクチン効果判定の研究に有用である。

結核症の研究に猿を用いることは有用と考えられる。

MT-1,-2、PT-1,-2、MPB64-T2,-T6、pncA-7,-10、pncA-7,-11 の 5 組のプライマーを用いて *M. tuberculosis* と *M. bovis* の鑑別が可能になった。また、*M. africanum* は *M. tuberculosis* と同義語とすべきであることがわかった。

リステリアのエスケープ因子である LL0 の毒性活性部位と免疫賦活活性部位は解離することが可能であり、その免疫賦活活性は感染防御免疫応答の誘導に応用が可能である。今後は結核菌および類似の抗酸菌について、同様のエスケープ因子の探索と宿主応答刺激活性を解析していきたい。

今回の研究により、少なくとも 2 つのことが示唆された。まず、*M. avium* は感染する宿主により性質（動物種に対する親和性や臓器親和性）が変化する可能性がある。今回、由来の異なる *M. avium* 株をマクロファージに感染させたところ、実際に細胞内における菌数変化のパターンは株により異なっており、ブタの細胞で最もよく増殖したのは、ブタ由来の株であった。また、ブタではマウスと異なり、系統によって *NRAMP1* 遺伝子に多様性が存在する可能性が考えられる。マウスにおいては同遺伝子の 1 塩基すなわち 1 アミノ酸の変化が抵抗性を感受性に変える。今回の豚 *NRAMP1* の塩基配列は Tuggle らの報告と一部異なっていた。このことは、ブタの *NRAMP1* 遺伝子には数種のパターンの塩基配列が存在することを意味しているのかもしれない。

ブタに果たして抗酸菌に対する感受性/抵

抗性の明確な形質の違いが存在するのかどうか、また、*NRAMP1* 遺伝子が関与しているのかどうかは今回の実験では明らかにできなかった。今後さらに検体を増やし、豚 *NRAMP1* の多様性をあきらかにするとともに、感受性/抵抗性形質発現をマクロファージを用いた *in vitro* 実験系で確立してゆくことが必要となるであろう。

GM-マクロファージは、IL-10 産生能を持たず IFN- γ 産生を抑制しないが、M-マクロファージは IL-10 産生を介して DNA 合成と IFN- γ 産生を抑制する。

MPB64 の抗原性が診断薬あるいはワクチン候補として有用か否かを検討するためは、モルモットばかりでなく、他の動物種での成績を比較検討する必要があることから、今回、マウスでの皮膚反応、*in vitro* の細胞増殖反応、IFN- γ 産生誘導能の検討を行った。MPB64 は抗原性の特異性から、将来、MPB64 を診断薬あるいはワクチン抗原として用いる際は、IFN- γ など Th1 タイプのサイトカイン産生をもたらすアジュバントとの併用が考慮されるべきかもしれない。

F. 研究発表

1. 論文発表

Tohru Tokunaga, Toshiko Yamamoto and Saburo Yamamoto: How BCG led to the discovery of immunostimulatory DNA. *Jpn. J. Infectious Diseases* (in press).

R. M. Nakamura, M. A. Velmonte, K. Kawajiri, C. F. Ang, R. A. Frias, M. T. Mendoza, J. C. Montoya, I. Honda, S. Haga, I.

Toida. MPB64 mycobacterial antigen: a new skin-test reagent through patch method for rapid diagnosis of active tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 78, 541-546, 1998

Ohya,S., Xiong,H., Tanabe,Y., Arakawa,M. & Mitsuyama,M. : Killing mechanism of *Listeria monocytogenes* in activated macrophages as determined by an improved assay system. *J.Med.Microbiol.* 47(2):211-215, 1998.

Yoshimoto,T., Wang,C., Yoneto,T., Waki,S., Sunaga,S., Komagata,Y., Mitsuyama,M., Miyazaki,J. & Nariuchi,H.: Reduced Th1 responses in interleukin-12 p40 transgenic mice. *J.Immunol.*,160:588-594, 1998.

Kobayashi,T., Ohmori,T., Yanai,M., Takeshita,Y. & Mitsuyama,M. : Protective effect of administration of skim milk on exogenous and endogenous infection in mice. *Microbiol. Immunol.* 42(3):203-209, 1998.

Tachibana,T., Matsuyama,T. & Mitsuyama,M.: Characteristic infectivity of *Sporothrix schenckii* to mice depending on routes of infection and inherent fungal pathogenicity. *Medical Mycology* 36(1):21-27, 1998.

Xiong,H., Ohya,S., Tanabe,Y. & Mitsuyama,M.: Administration of killed bacteria together with listeriolysin O induces protective immunity against *Listeria monocytogenes* in mice. *Immunology* 94(1):14-21, 1998.

- Ohya,S., Tanabe,Y., Makino,M., Nomura,T., Xiong,H., Arakawa,M. & Mitsuyama,M. : The contribution of reactive oxygen intermediates and reactive nitrogen intermediates to bactericidal mechanisms differ in macrophages activated pre- and postinfection. *Infect Immun* 66(9):4043-4049, 1998.
- Tanabe,Y., Xiong,H., Nomura,T., Arakawa,M. & Mitsuyama,M. :Induction of protective T cells against *Listeria monocytogenes* in mice by immunization with a non-immunogenic strain of bacteria and liposome-encapsulated listeriolysin O. *Infect Immun* 67(2) 568-575, 1999.
- Ebe Y, Hasegawa G, Takatsuka H, Umezu H, Watanabe H, Mitsuyama M, Arakawa M, Mukaida N, Matsushima K, & Naito M. : The role of Kupffer cells and regulation of neutrophil migration into the liver by a C-X-C chemokines in primary listeriosis. *Pathology International* , in press, 1999.
- Saito, H., Y. Kashiwabara, and K. Kobayashi. 1998. Present and future in leprosy research. In *Clinical Mycobacteriology*. M. Casal, editor. Barcelona: Prous Science/Spain. 51-62.
- Kobayashi,K., K. Hashimoto, M. Gidoh, M. Kai, and H. Saito. 1998. Possible involvement of type 1 helper T cell/interferon-g inducing cytokines in protection against experimental *Mycobacterium leprae* infection in mice. In *Clinical Mycobacteriology*. M. Casal, editor. Barcelona: Prous Science/Spain. 109-114.
- Kai, M., H. Saito, K. Kobayashi, and Y. Kashiwabara. 1998. *Mycobacterium avium* complex with different reactivity to DNA probes. In *Clinical Mycobacteriology*. M. Casal, editor. Barcelona: Prous Science/Spain. 159-164.
- Saito, H., M. Gidoh, M. Kai, and K. Kobayashi. 1998. Chemoprophylaxis against *Mycobacterium avium* complex induced in mice. In *Clinical Mycobacteriology*. M. Casal, editor. Barcelona: Prous Science/Spain. 403-413.
- Kawasaki, S., H. Takizawa, T. Ohtoshi, N. Takeuchi, T. Kohyama, H. Nakamura, T. Kasama, K. Kobayashi, K. Nakahara, Y. Morita, and K. Yamamoto. 1998. Roxithromycin inhibits cytokine production by and neutrophil attachment to human bronchial epithelial cells in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 1499-1502.
- Kasahara, K., I. Sato, K. Ogura, H. Takeuchi, K. Kobayashi, and M. Adachi. 1998. Expression of chemokines and induction of rapid cell death in human blood neutrophils by *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis.* 178: 127-137.